

海生生物骨格形成に關与する 酸性糖タンパク質の構造と機能の解析

*Structure and function analyses of the acidic
glycoproteins involved in skeleton formation of marine creatures*

佐俣哲郎

麻布大学大学院環境保健学研究科

Tetsuro Samata

Graduate School of Environmental Health, Azabu University

Abstract: Molluscan shell comprises two types of crystals, aragonite or calcite, which are arranged to form various shell microstructures. Shell of *Pinctada fucata* is divided into two microstructures, an aragonitic nacreous layer and a calcitic prismatic layer. It is widely believed that organic matrix (OM) is involved in regulation and control of both the crystal polymorphism and shell microstructure (Watabe and Wilbur, 1960; Lowenstam, 1981; Weiner, 1984). Analyses of genes encoding OM-proteins have been carried out those in nacreous layer of pearl oyster because of its industrial value. Meanwhile, in recent years, MSI31 and Plismalin 14 have been identified in prismatic layer. The mechanism of molluscan shell formation is still unclear, even in case of *P. fucata*. Especially, the mechanism about the crystallization of aragonite or calcite in the alternative is left unsolved.

Samata identified and characterized the N-terminus amino acid sequences of several components (unpublished data). The present study was conducted to identify primary structure of one of these components by cDNA cloning.

Consequently, approximately between 2.5 to 3 kb nucleotide fragments were amplified and sequenced. The primary structures of the proteins encoded by these cDNA were composed of several kinds of repeat sequences rich in glycine and alanine. On the other hand, they are scarce in the acidic and basic amino acids. These features have not been reported in other OMs in molluscan shells so far. Homology analysis showed partial similarity of the amino acid sequence of the molecule with the insoluble matrix components in molluscan shells and sea urchin spicules.

Further analyses of gene expression of the cDNA clearly indicated the specific expression of these molecules in the mantle epithelium responsible for the nacreous and prismatic layers. These results imply involvement of them in shell formation of pearl oyster as insoluble matrix proteins.

1. 目的

サンゴの骨格や有孔虫の殻体のように、生物が作り出す鉱物をバイオミネラルといい、バイオミネラルの形成作用をバイオミネラルリゼーションという。

バイオミネラルは、植物や微生物から脊椎動物に至る広範な生物種に、多様な鉱物として存在する。バイオミネラルリゼーションの現象は、6億年以上もの昔から保存されてきたことが知られているが、その機構は今なお解明されておらず、多くの謎の部分

残している。

バイオミネラル化の研究は、ヒトの骨や歯を中心に、医学、歯学、化学、生化学、分子生物学、進化系統学などの多くの分野で行われてきた。一方、無脊椎動物のバイオミネラルについては、軟体動物の殻体に関する研究が最も進んでいる。軟体動物殻体のバイオミネラル化は、無機結晶の主成分である炭酸カルシウムの他に、多様なタンパク質、多糖類および脂質などの有機化合物が関連して起こる。炭酸カルシウムの結晶には、アラレ石と方解石という2種類の結晶多形が存在し、この結晶多形が、軟体動物の系統および殻体微細構造と密接な関連を持って分布する。この結晶多形や殻体微細構造の形成と制御に、主にタンパク質からなる有機基質 (organic matrix ; OM) が深く関与していると考えられている。軟体動物のバイオミネラル化の研究は、殻体微細構造の研究、OMの構造や機能の研究やOMをコードする遺伝子の研究まで多岐に渡って行われている。

近年、バイオテクノロジーの進歩に伴い、軟体動物OMをコードする遺伝子の同定が進められているが、それらのほとんどはアラレ石からなる真珠層および方解石からなる稜柱層中の可溶性OMに関するもので¹⁻⁹⁾、結晶形成の基盤となる不溶性OMに関する情報は少ない^{10, 11)}。

本研究では、殻体形成に関与していると思われる新規の酸性の糖タンパク質からなるOM成分の同定とその機能の推定を行うことを目的とした。本研究結果は、当該タンパク質の今後の機能解析と合わせて、軟体動物殻体形成機構の全容解明につながる重要なものであると考えられる。

2. 方法

試料

三重県志摩市賢島・若狭大月真珠(株)より送付された、日本産アコヤガイ、*Pinctada fucata martenshii* 生体試料の外套膜外側を切り出し、すぐに液体窒素で凍結後、 -80°C で保存した。

Total RNA 抽出

200 mgのアコヤガイ外套膜外縁部の組織から、ISOGEN (NIPPONGENE, Tokyo, Japan) を用いて

Total RNA 抽出を行った。RNA 収量は、分光光度計 (GeneQuant, Pharmacia Biotech., Stockholm, Sweden) を用いて測定し、RNA100ug を、Promega SV RNA Isolation System で精製した。

RT

精製済み Total RNA 4.5 ug を SuperScript III RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen, Tokyo, Japan) を用いて逆転写した。逆転写用のプライマーとして、oligo (dT)₁₇ にアダプター配列 (AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGG GTAC) を付加したアダプタープライマーを用いた。

3' RACE

フォワードプライマーには、アコヤガイ稜柱層 35 kDa 成分の N 末端アミノ酸配列を基に作成した Degenerate primer (TTYGAYACNAAYAAAYCCNGG) を用い、リバープライマーには、逆転写の際に付加したアダプター配列 (AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGG GTA C) を用いた。PCR 反応は、 98°C 2 分、その後 35 サイクルの 98°C 15 秒、 51°C 30 秒、 74°C 3 分で、サーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories, California, USA) を用いて行った。

TA クローニング

Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) でゲル抽出を行い、その後 Taq-polymerase I unit を用いて平滑末端への A-tailing を行った。その後、p-GEM T easy vector System (Invitrogen) を用いて Ligation 反応を 4°C で 16 時間行い、その後 JM109 high-efficiency competent cells (Promega, Wisconsin, USA) に形質転換した。アンピシリンセレクションと青/白カラースクリーニングによって選別したポジティブクローンをシーケンス解析に用いた。

DNA シークエンス解析

アンピシリンセレクションとカラースクリーニングにより選別されたポジティブクローンについて、さらに M13 forward, reverse プライマーを用いた PCR によりインサートチェックを行い、インサートが確認されたクローンについて、アルカリプレップ法でプラスミド精製を行った。Thermo Sequence

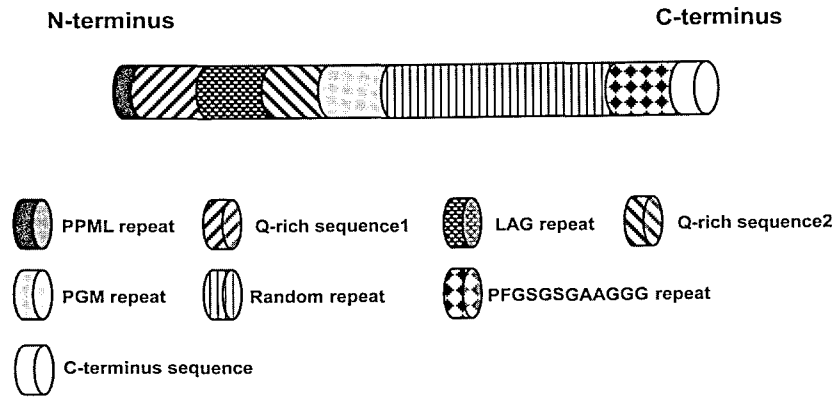


Fig. 1 Schematic representation of mosaic structure of MPN88.

Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences, Tokyo, Japan) で蛍光標識し, DNA auto Sequencer DSQ-1000L (SIMADZU, Kyoto, Japan) でDNA シーケンス解析を行った。

3. 結果と考察

3.1 結果

3' RACE 法

3'RACEの結果, 約900 bp, 1500 bp, 2000 bpの3種類のヌクレオチド断片が増幅された。

また, 遺伝子特異的プライマーを用いたPCRの結果, 約500 bpと配列1000 bpの2種類のヌクレオチド断片が増幅された。

5' RACE 法

5'RACEの結果, 約900 bpと1300 bpの2種類のヌクレオチド断片が増幅された。

シーケンス解析

得られたヌクレオチド断片のシーケンシングから8種類の塩基配列が得られたが, これらの配列は互いに良く類似していた。全てのcDNAのスタートコドンはnucleotide position (nt.) 183に, ストップコドンは, nt. 2516, 2588, 2660, 2732, 2981, 3053, 3125 and 3197に存在した。また, すべてのcDNAにpoly Aシグナルを持つpoly A配列が確認された。一方, 900 bpヌクレオチド断片のシーケンシングの結果, この断片が, 既知成分であるshematrin¹¹⁾と相同であることが明らかになった。

同定されたcDNA断片から推定されたタンパク質成分の一次構造の特徴

上記のヌクレオチド配列がコードするタンパク質成分の推定アミノ酸配列の特徴の第一は, 分子全体にわたって, グリシン, アラニンおよび疎水性アミノ酸に富む点であった。この特徴は, 真珠層と稜柱層から報告された不溶性有機基質であるMSI60およびMSI31に共通に認められるものである。一方, これらの成分と比較して, 酸性と塩基性のアミノ酸, すなわち親水性のアミノ酸含有量が極端に低い点がこの成分の第二の特徴である。さらに, この成分は, グリシン, アラニン, ロイシンのみから成る配列, プロリン, メチオニン, グリシンをランダムに繰り返す部分, プロリン, グリシン, セリン, フェニルアラニンからなる特徴的な繰り返し配列を有していた (Fig. 1)。

得られた塩基配列およびアミノ酸配列の Homology 検索

BLASTによりNCBIデータベース内で, これらのヌクレオチド断片のホモロジー検索を行った結果, フィルター (Low-complexity) を使用した場合は, この成分と高いホモロジーを有する成分は検索されなかった。Filterを除去した場合には, このヌクレオチド断片によりコードされる成分と高いホモロジーを有する成分は検索されなかったが, 部分的なアミノ酸配列上のホモロジーを有する成分として以下のものが検索された。すなわち, まず, collagen-like proteinの一種であるpericardine [Drosophila melanogaster]: Length = 1729と, ほぼ分子の全長に

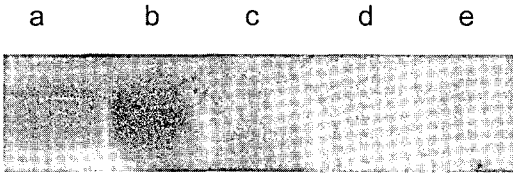


Fig. 2 Electroforetogram showing tissue specific expression of MPN88 transcript analyzed by northern hybridization. a: mantle pallial, lane b: mantle edge, lane c: adductor, lane d: gill, lane e: heart.

わたって27-29%の相同性が認められた。しかしこれは、配列上の類似性ではなく、両成分を構成するアミノ酸組成上の類似性にすぎなかった。第二に、この成分は、不溶性の構造タンパク質である keratin やクモの糸を構成する fibroin と部分的に30%以上の高いホモロジーを示した。さらに、炭酸カルシウムから成るウニの棘の構成成分である HSM41, SM50 との間でも、プロリン, グリシン, メチオニンのみからなる配列の存在や繰り返し配列の間にグルタミンが点在するなど点での類似性が認められた。

ノーザンハイブリダイゼーション解析

ノーザンハイブリダイゼーション解析の結果、マントル上皮外縁部（真珠層形成部位）と端部（稜柱層形成部位）の両組織において、約2.8 kbから3.5 kbに渡る広い領域で強いシグナルが検出された。一方、貝柱、心臓、えらの各組織に対しては、シグナルが検出されなかった（Fig. 2）。

3.2 考察

本研究で塩基配列が決定されたcDNAがコードするタンパク質成分には、777から1004のアミノ酸残基を持つ複数の成分が含まれていた。ノーザンハイブリダイゼーション解析の結果は、これらの成分が、アコヤガイ真珠層と稜柱層の形成に特異的に関与していることを示しており、アコヤガイ殻体の形成に関与する有機基質タンパク質の一種であると考えられる。ホモロジー検索の結果、これらのタンパク質成分と高い相同性を示す成分は検索されなかったことから、この成分が新規成分であることが強く示唆された。このため、これらの成分をMPN88（molluscan shell prismatic and nacreous layer 88 kDa component）と命名した。一方、この成分と、アコヤ

ガイ不溶性有機基質構成成分であるMSI60, MSI31やウニの棘形成に関与する不溶性タンパク質のアミノ酸配列との間に部分的な相同性が認められた。また、アミノ酸組成分析の結果からは、可溶性有機基質タンパク質の中には、この成分と類似の組成を示す成分が存在しない一方、不溶性有機基質タンパク質中にMPN88と類似の組成を示す成分が存在した¹²⁾。このことは、MPN88が、アコヤガイの殻体形成に関与する新規の不溶性成分である可能性を強く示唆している。

上記の結果は、MPN88がアコヤガイへ殻体形成において、結晶多形や殻体微細構造とは無関係に、真珠層と稜柱層の形成に普遍的に関与している初めての不溶性有機基質である可能性を示している。また、種を超えて類似の構造を有する成分が存在することから、MPN88が無脊椎動物の石灰化に普遍的に関与している成分である可能性も考えられる。

今後の課題として、MPN88が、実際にアコヤガイ殻体中に存在することの確認実験が必要とされる。これまでに報告された aspein⁷⁾ や asprich⁹⁾ などのいくつかの成分が、有機基質タンパク質として未だ殻体中からは同定されておらず、このため、殻体形成とこれらの成分との間の直接の関連性を議論する障害となっている。また、この成分の機能を解析するために、発現タンパク質を用いた結晶形成実験等も行いう必要があるだろう。これらの追加実験の結果、MPN88の軟体動物の殻体形成における役割の解明が進展することが期待される。

文 献

- 1) Miyamoto H, Miyashita T, Okushima M, Nakano S, Morita T & Matsushiro A (1996) A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **93**, 9657-9660.
- 2) Shen X, Belcher AM, Hansma PK, Stucky GD & Morse DE (1997) Molecular cloning and characterization of lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens*. *J Biol Chem* **272**, 32472-32481.
- 3) Sarashina I & Endo K (2001) The complete primary structure of molluscan shell protein 1 (MSP-1), an acidic glycoprotein in the shell matrix of the scallop *Patinopekten yessoensis*. *Mar Biotechnol (NY)* **3**, 362-369.
- 4) Samata T, Hayashi N, Kono M, Hasegawa K, Horita C

- & Akera S (1999) A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*. *FEBS Lett* **462**, 225-229
- 5) Kono M, Hayashi N & Samata T (2000) Molecular mechanism of the nacreous layer formation in *Pinctada maxima*, *Biochem Biophys Res Commun* **269**, 213-218.
- 6) Marin F, Corstjens P, de Gaulejac B, de Vrind-De Jong E & Westbroek P (2000) Mucins and molluscan calcification. Molecular characterization of mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel *Pinna nobilis* (Bivalvia, pteriomorphia). *J Biol Chem* **275**, 20667-20675.
- 7) Tsukamoto D, Sarashina I & Endo K (2004) Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells. *Biochem Biophys Res Commun* **320**, 1175-1180.
- 8) Suzuki M, Murayama E, Inoue H, Ozaki N, Tohse H, Kogure T & Nagasawa H (2004) Characterization of Prismalin-14, a novel matrix protein from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochem J* **382**, 205-213.
- 9) Gotliv BA, Kessler N, Sumerel JL, Morse DE, Tuross N, Addadi L & Weiner S (2005) Asprich: A novel aspartic acid-rich protein family from the prismatic shell matrix of the bivalve *Atrina rigida*. *Chembiochem* **6**, 304-314.
- 10) Sudo S, Fujikawa T, Nagakura T, Ohkubo T, Sakaguchi K, Tanaka M, Nakashima K & Takahashi T (1997) Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature* **387**, 563-564.
- 11) Yano M, Nagai K, Morimoto K & Miyamoto H (2006) Shematin: a family of glycine-rich structural proteins in the shell of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **144**, 254-262.
- 12) 佐藤彩 (2007) アコヤガイ殻体可溶性有機基質と不溶性有機基質中の各成分のアミノ酸組成. 麻布大学卒業論文